文章编号：1000-5404(2010)19-2147-02

经验交流

联合丹参治疗对慢性阻塞性肺疾病患者血清 MMP-9、TIMP-1 的影响

王海旭[1,2]，刘　晖[2]，齐曼古力·吾守尔[1]，刘北林[2]，王利平[2]，张　幸[2]，赵　静[2]，刘慧芳[2]，薛　冰[3]，王雪涵[3]
(830011 乌鲁木齐，新疆医科大学：第一附属医院呼吸科[1]，第五附属医院呼吸科[2]，第五附属医院检验科[3])

【关键词】　丹参；慢性阻塞性肺疾病；MMP-9；TIMP-1；MMP-9/TIMP-1
【中图法分类号】　R563.805　　【文献标志码】　B

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease，COPD)发病机制尚不清楚，目前最被接受的是蛋白酶/抗蛋白酶失衡学说[1,2]。基质金属蛋白酶-9(matrixmetalloproteinases-9，MMP-9)可能在 COPD 的发展中起重要作用。组织金属蛋白酶抑制物-1(tissueinhib torsofmatrixmetalloproteinases-1，TIMP-1)作为 MMP-9 的抑制剂，与 MMP-9 共分泌，MMP-9/TIMP-1 的动态平衡目前被认为是反映气道组织破坏和修复动态平衡的标志。丹参是一种较理想的弹性酶抑制剂，具有良好的保护肺弹力纤维及防治实验性 COPD 的效应[3]。本研究采用联合丹参静脉用药，观察对 COPD 患者血清 MMP-9、TIMP-1、MMP-9/TIMP-1 值的影响，为防治 COPD 提供理论依据。

1　资料与方法

1.1　病例资料

选取我院 2008－2009 年住院的 COPD 患者 60 例，均符合 2007 年 COPD 诊治指南诊断标准[4]，入院时均为急性加重期，选择中度、重度 COPD 患者，根据年龄、性别、病程、COPD 分级按 1∶1 配对入组，分为丹参治疗组(30 例)和常规治疗组(30 例)。选取同期健康体检者 30 例作为对照。受检者均排除支气管哮喘、合并心、肝、肾等其他疾病。丹参治疗组与常规治疗组患者年龄、性别、病程、病情严重度比较差异无统计学意义($P>0.05$)。对照组年龄、性别、吸烟史与两组 COPD 患者比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2　方法

丹参治疗组和常规治疗组均进行 COPD 常规治疗，丹参治疗组除常规治疗外再给予丹参粉针剂 800 mg＋5% 葡萄糖注射液 250 ml 静脉滴入，每天 1 次。两组患者治疗前(急性期)及治疗后(稳定期)均收集 2 ml 空腹静脉血，应用 MMP-9、TIMP-1 试剂盒(均购自博士德生物工程有限公司)，采用双抗体夹心 ELISA 法检测血清 MMP-9、TIMP-1 浓度。

1.3　统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 SPSS 15.0 统计软件，配对资料采用配对 t 检验。多组比较满足方差齐性，采用方差分析法，不满足方差齐性采用秩和检验，如结果有统计学差异($P<0.05$)，采用 SNK 法进行两两比较。

【通信作者】　齐曼古力·吾守尔，电话：(0991)4362690，E-mail：hexiaoxiao2010@sina.com

2　结果

丹参治疗组与常规治疗组 MMP-9、TIMP-1、MMP-9/TIMP-1 值治疗前(急性期)均明显高于治疗后(稳定期)和对照组，两组 3 指标稳定期亦均高于对照组($P<0.05$)；丹参治疗组与常规治疗组 MMP-9 值在治疗前无统计学差异，治疗后丹参治疗组低于常规治疗组($P<0.05$)。两治疗组 TIMP-1 值、MMP-9/TIMP-1 值在治疗前后均无统计学差异($P>0.05$)。见表 1。

表 1　各组治疗前后 MMP-9、TIMP-1 值及 MMP-9/TIMP-1 值比较($n=30$)

组别	MMP-9(ng/ml)		TIMP-1(ng/ml)		MMP-9/TIMP-1	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
丹参治疗组	535.89±7.06	51.08±0.64^{c}	326.66±7.84	32.80±0.59^{c}	1.64±0.05	1.56±0.03^{c}
常规治疗组	530.25±6.48	52.56±0.77^{ac}	329.09±7.43	33.08±0.61^{c}	1.61±0.04	1.58±0.04^{c}
对照组	10.38±0.12^{ab}	10.38±0.12^{ab}	8.00±0.43^{ab}	8.00±0.43^{ab}	1.30±0.07^{ab}	1.30±0.07^{ab}

a：$P<0.05$，与丹参治疗组比较；b：$P<0.05$，与常规治疗组比较；c：$P<0.05$，与治疗前比较

3　讨论

呼吸道细胞外基质重塑是 COPD 不可逆性气流受限的重要病理基础[5]。目前认为，MMP-9 及 TIMP-1 是调解 ECM 降解合成的主要酶类，MMP-9/ TIMP-1 值失衡是气道重塑的重要机制。以往的研究已经证明，中药丹参具有良好的保护弹力纤维、预防动物实验性肺气肿的效应。

我们在常规治疗基础上加用丹参针剂治疗，结果显示，两组血清 MMP-9、TIMP-1、MMP-9/TIMP-1 水平急性期明显高于稳定期和健康对照组，稳定期亦高于健康对照组，与 Vignola 等[6]的研究结果一致。这提示 MMP-9 与 COPD 的气道炎症有关，MMP-9 在气道的聚集增加与 COPD 的急性发作有一定联系。在急性期 MMP-9 增加的同时，TIMP-1 亦增加，表明 TIMP-1 亦参与了 COPD 的气道炎症反应过程。本结果显示两组 MMP-9 的增加幅度＞TIMP-1 的增加幅度。正常情况下，MMP-9 及 TIMP-1 处于平衡状态，如 MMP-9/TIMP-1 值增高，表明气道壁以炎症反应为主；如 MMP-9/TIMP-1 值下降，则表明以修复为主。说明在两组 COPD 患者急性期以气道炎症为主，稳定期则以气道修复为主。本结果显示，两组血清 TIMP-I 水平、血清 MMP-9/TIMP-1 水平比较，均无统计学差异。两组治疗后达稳定期，MMP-9 水平丹参组低于常规治疗组，与霍建民等[3]的动物实验结果一致。表明丹参可有效的抑制 MMP-9 的过度分泌，进一步验证了其可降低 COPD 患者弹性蛋白酶的活性。丹

参能够明显抑制急性加重期肺组织 MMP-9 的活性，降低 MMPs 活性，从而使细胞因子、炎症因子减少，可能是丹参治疗 COPD 的主要机制之一，有待进一步研究。

参考文献：

[1] 孔英君，霍建民，孙文学，等. 慢性阻塞性肺疾病患者急性加重期血清基质金属蛋白酶抑制剂及基质金属蛋白酶9浓度与肺功能变化的关系[J]. 中国急救医学，2007，27(7)：587－589.

[2] 刘双林，李琦，吴学玲，等. COPD 急性加重时影响病死率危险因素的回顾性病例对照研究[J]. 第三军医大学学报，2009，31(14)：1394－1396.

[3] 霍建民，桑玉兰，陈晶莹，等. 细胞因子、明胶酶 B 在烟雾暴露大鼠慢性阻塞性肺疾病发病中的作用及丹参酮 II-A 干预研究[J]. 国际呼吸杂志，2007，27(4)：241－245.

[4] 中华医学会呼吸病学会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2007 年修订版)[J]. 中华内科杂志，2007，46(3)：254－261.

[5] 陈远骥，王伯章. 基质金属蛋白酶-9 与慢性阻塞性肺疾病的研究[J]. 医学总述，2006，12(11)：648－651.

[6] Vignola A M, Riccobono L, Mirabella A, *et al*. Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airflow obstruction in asthma and chronic bronchitis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 158(6)：1945－1950.

(收稿：2010-07-14 修回：2010-08-02)

(编辑　汪勤俭)

经验交流

文章编号：1000-5404(2010)19-2148-02

颠龙合剂的微生物限度检查方法验证

李国成，刘春霞，余晓霞　(510120 广州，中山大学附属第二医院药学部)

【关键词】 颠龙合剂；微生物限度检查；方法学验证

【中图法分类号】 R286.02　【文献标志码】 B

微生物限度检查法是检查非规定制剂及原、辅料受微生物污染程度的方法，检查项目包括细菌数、霉菌数、酵母菌数以及控制菌检查[1]。由于每个具有抑菌作用的药品的抑菌效果不同，所以适合各个药品的微生物限度检查法也不相同。颠龙合剂是我院配制的常用制剂，批准文号：粤 H20070911。本研究采用常规法对颠龙合剂的微生物限度检查进行方法学验证，以确认其微生物限度检查方法的有效性，为更好地控制本制剂的质量提供科学的依据和方法。

1　材料与方法

1.1　材料

超净工作台(苏净集团安泰公司)、303A-1 生化培养箱(上海浦东荣丰科学仪器有限公司)、SPX-100B 生化培养箱(上海悦丰仪器表有限公司)。颠龙合剂(批号：201002238、201002258、201003026)由中山大学附属第二医院制，规格：3%×60 ml。营养琼脂培养基(批号：081217)、胆盐乳糖培养基(批号：090309)、营养肉汤培养基(批号：090225)、玫瑰红钠琼脂培养基(批号：090203)、曙红亚甲蓝琼脂培养基(EMB，批号：080911)均由北京三药科技开发公司生产。大肠埃希(Escherichia coli)[CMCC(B)44102]、金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)[CMCC(B)26003]、菌种枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)[CMCC(B)63501]、白色念珠菌(Candida albicans)[CMCC(F)98001]、黑曲霉(Aspergillus niger)[CMCC(F)98003]均来源于中国药品生物制品检定所。

1.2　细菌、霉菌及酵母菌计数方法验证

1.2.1　菌液的制备[2]　分别接种大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌至营养肉汤培养基，经 35 ℃培养 24 h，取其培养物，用无菌生理盐水按 10 倍稀释至 10^{-7}～10^{-5}，为 50～100 cfu/ml 的菌悬液备用。接种白色念珠菌至改良马丁培养基，经 25 ℃培养 24～48 h，取其培养物，用无菌生理盐水按 10 倍稀释至 10^{-7}～10^{-5}，为 50～100 cfu/ml 的菌悬液备用。取 2～8 ℃保藏的黑曲霉孢子混悬液，稀释至 50～100 cfu/ml 的孢子悬液备用。

1.2.2　供试液的制备　取样品 10 ml 加 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 ml，混匀，作为 1∶10 供试液。

1.2.3　供试品对照组制备　取供试液 1 ml/皿注入平皿，立即倾注琼脂培养基，平行制备 2 个平皿，培养、计数。

1.2.4　试验组制备　取供试液 1 ml/皿注入平皿，每个平皿供试液分别加入上述制备的菌液 50～100 cfu，立即倾注琼脂培养基，平行制备 2 个平皿，培养、计数。

1.2.5　菌液组制备　取上述 5 种代表菌株培养液的菌液各 1 ml，注皿，立即倾注琼脂培养基，平行制备 2 个平皿，培养、计数。

1.2.6　试验组回收率　按文献[2]公式计算。

试验组回收率＝(试验组菌落数－供试品组菌落数)/菌液组菌落数×100%

1.3　控制菌检查方法验证

试验组：取供试品原液 1 ml 加入到 100 ml 胆盐乳糖增菌培养基中，加入 10～100 cfu 大肠埃希菌；同时取金黄色葡萄球菌 50～100 cfu 代替大肠埃希菌按试验组方法作阴性对照组。按照文献[1]的方法进行检查。

2　结果

采用常规方法检验供试品，人工污染 5 株代表菌株，进行 3 次独立的平行试验，金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌及黑曲霉每次试验的回收率试验均高于 70%(表 1)。控制菌检查结果见表 2：颠龙合剂对大肠埃希菌没有

【通信作者】 刘春霞，电话：(020)81332427，E-mail：lcxgz@163.com